

Białka przeciwlodowe i ich potencjalne zastosowanie w krioprezerwacji

Natalia Rutkowska

Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „FERMENT”

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechnika Łódzka

nl.rutkowska@gmail.com

Praca napisana pod opieką dr Aleksandry Twardej-Cłapy

Białka przeciwlodowe (z ang. *ice binding proteins* - IBPs) są sposobem na adaptację wielu organizmów psychrofilnych do niskich temperatur, tj. poniżej 5 °C. Zostały one wyizolowane z bakterii, drożdży, grzybów czy nawet organizmów wyższych żyjących w rejonach Arktyki oraz Antarktydy. W środowisku naturalnym występuje kilka rodzajów tych białek. Jedne z nich - białka przeciwarzamraniowe (z ang. *antifreeze proteins* - AFPs) - wiążą się do lodu, co powoduje zwiększenie termicznej histerezy i inhibicję rekrytalizacji, co zapobiega tworzeniu się większych kryształów lodu. Ich powstanie mogłoby spowodować uszkodzenie organelli komórkowych, a w rezultacie nawet śmierć komórki. Z kolei białka nukleacyjne lodu (z ang. *ice-nucleating proteins* - INPs) pozwalają na formowanie kryształów w temperaturach między -8 °C a -15 °C.

Odkrycie oraz zbadanie właściwości białek przeciwlodowych sprawiło, że nastąpił wzrost zainteresowania nimi pod kątem przemysłowym. Są one przydatne tam, gdzie istotna jest ochrona przed formowaniem większych kryształów lodu - m.in. w przemyśle spożywczym, rolnictwie czy medycynie, a dokładniej krioprezerwacji. Krioprezerwacja pozwala na długoterminowe przechowywanie próbek biologicznych. Wysoką przeżywalność komórek po rozmrażaniu zapewnia dodatek krioprotektantu, np. DMSO (dimetylosulfotlenek) czy glicerolu. Jednak najczęściej używane krioprotektanty nie inhibują efektywnie rekrytalizacji oraz są cytotoksyczne, dlatego poszukiwane są nowe rozwiązania. W poniższym artykule zostało opisane zastosowanie rekombinowanych białek przeciwlodowych pochodzących z arktycznych drożdży *Glaciozyma* sp. (LeIBP), które zwiększają żywotność krioprezerwowanych ssaczych komórek.

Wstęp

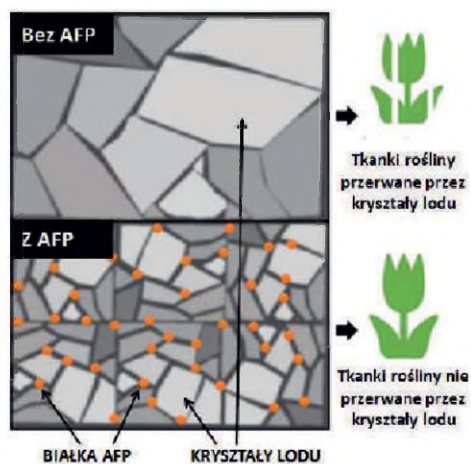
Psychrofile, czyli organizmy żyjące w niskich temperaturach (poniżej 15°C), zasiedlają więcej niż 80%

powierzchni ziemi. Są w stanie bytować w glebach polarnych i wysokogórskich, zimnych wodach oceanicznych czy nawet na lodowcach, dzięki posiadanym różnorodnym adaptacjom do

takiego środowiska wytworzonym w toku ewolucji. Na poziomie molekularnym do takich adaptacji można zaliczyć m.in. syntezę krioprotektantów czy zwiększenie płynności błony lipidowej przez zmianę składu kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych [1]. Ze względu na zakres tolerancji na temperaturę, wyróżnia się dwie grupy organizmów psychrofilnych – fakultatywne i obligatoryjne. Psychrofile fakultatywne preferują środowiska zimne, ale są w stanie przeżyć w warunkach poniżej 0°C. Żyją w środowiskach, które są zmienne w zależności od pór roku. Z kolei psychrofile obligatoryjne można spotkać w stale zimnych regionach, w strefach podbiegunowych, morskich głębinach, na lodowcach. Nie lubią temperatury większej niż 20°C, a najbardziej optymalna dla nich to poniżej 15°C [2]. Nie tylko temperatura jest czynnikiem utrudniającym przetrwanie w takich warunkach, do innych zaliczamy również – brak wody, wysokie zasolenie, promieniowanie UV oraz niską dostępność składników odżywczych. Imponująca zdolność organizmów psychrofilnych nie tylko do przeżycia, ale i rozwoju w takich warunkach przyciągnęła uwagę naukowców. Odkrycie różnych rodzajów białek przeciwlodowych u wielu gatunków bakterii [3], drożdży [4], grzybów [5], a nawet owadów i roślin [6], wzbudziło zainteresowanie ze względu na potencjalną możliwość zastosowania ich w wielu gałęziach przemysłu, medycynie, czy rolnictwie.

Rodzaje i funkcje białek przeciwlodowych

Białka przeciwlodowe (ang. *ice binding protein*, IBP), kluczowe dla przetrwania organizmów w niskich temperaturach, można podzielić na białka przeciwwzamarzaniowe (ang. *antifreeze protein*, AFP) oraz na białka nukleacyjne lodu (ang. *ice-nucleating protein*, INP). Białka INP inicjują formowanie się kryształów lodu w niskich temperaturach, a białka AFP obniżają temperaturę zamarzania cieczy w komórkach przez co zwiększają termiczną histerezę (ang. *thermal hysteresis*, TH), czyli różnicę między temperaturą rozmrażania i zamrażania, aby chronić przed Nielimitowanym rozrastaniem się kryształów lodu oraz hamują rekrytalizację lodu (ang. *ice recrystallization inhibition*, IRI), co zapobiega zamarzaniu cieczy w komórkach, a w konsekwencji ich śmierci. Współistnienie tych dwóch procesów – TH i IRI – sprawia, że tworzące się kryształy lodu są małe i niezabójcze dla komórek (Ryc.1) [7].

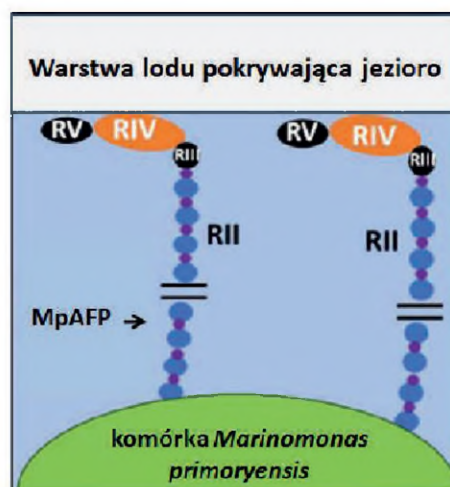


Ryc.1. Inhibicja rekrytalizacji lodu (IRI) przy obecności i jej braku białek AFP [7]

Przykładem mikroorganizmu wytwarzającego białko AFP jest arktyczna bakteria *Marinomonas primoryensis*, która syntetyzuje białko MpAFP w celu uzyskania dostępu do tlenu i składników odżywczych. MpAFP jest zewnątrzkomórkowym białkiem multimerycznym (o domenach zaznaczonych na rycinie jako RI-RV) ze strukturalnymi motywami wiążącymi jony Ca^{2+} , które z jednej strony zakotwiczone jest w błonie komórkowej bakterii, a z drugiej wiąże się z lodem (Ryc. 2). Z kolei chorobotwórcza bakteria atakująca rośliny - *Pseudomonas syringae* - w temperaturze od -5 do -12°C wytwarza białka INP, które zwiększają odporność na zamarzanie poprzez formowanie kryształów na zewnątrz komórki. [8]. Dlatego też białka INP mogą mieć związek z wirulencją tej bakterii - mogą powodować uszkodzenia nabłonka roślin, co daje bakteriom łatwy dostęp do składników odżywczych.

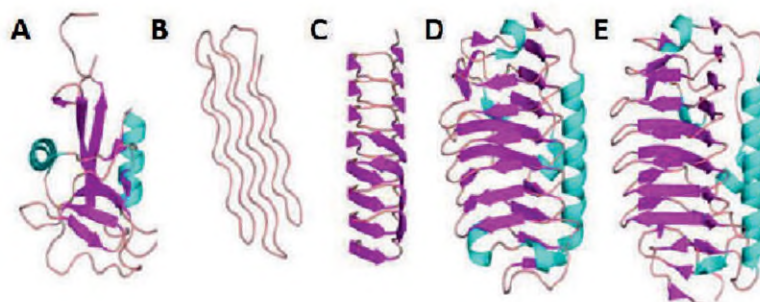
Struktura białek

W zależności od pochodzenia białka AFP różnią się od siebie strukturą



Ryc. 2. Wiązanie białka MpAFP z lodem w celu pozyskania ułatwionego dostępu do tlenu, światła i substancji odżywczych dla bakterii *Marinomonas primoryensis* [7]

przestrzenną- od długich równoległych α -helis do dużych uporządkowanych β -solenoidów [9] - oraz masą molekularną - od 3,24 kDa (białko pozyskane z flądry *Pseudopleuronectes americanus*) do 1,5 MDa (z Gramujemnych antarktycznych bakterii *Marinomonas primoryensis*) [10, 11]. Białka te uznano za odległe ewolucyjnie, będące rezultatem niezależnych od siebie procesów jak konwergencja czy horyzontalny transfer genów. Glikoproteiny (ang. *antifreeze glycoprotein*, AFPG) różnych gatunków ryb są



Ryc.3. Struktury białek przeciwarzamrazniowych pochodzących z wybranych organizmów (dane z bazy PDB). Od lewej: białko ryby *Sarritor leptorhynchus* (A), stawonoga *Hypogastrura nivicola* (B), rośliny uprawnej *Lolium perenne* (C), antarktycznej bakterii *Colwellia* (D) oraz arktycznych drożdży *Leucosporidium* (E) [7]

uznawane za pochodzące od genu kodującego trypsynogen, a AFP z roślin od genów kodujących chitynazy [7].

Zastosowanie w biotechnologii

Rekombinowane białka AFP wyizolowane z ryb są stosowane w przemyśle spożywczym w celu polepszenia jakości żywności utrwalonej przez zamrożenie, np. lodów [12], mięsa [13] czy warzyw [12]. Z kolei białka INP używane do celów przemysłowych pochodzą zwykle z bakterii. Podnoszą one temperaturę zarodkowania lodu, co skutkuje mniejszym zużyciem energii potrzebnej na zamrożenie żywności, a tym samym niższymi kosztami [14]. Bakterie te zostały też wyizolowane z próbek wody deszczowej oraz śniegu [15], co przemawia za stwierdzeniem, że mają one wpływ na procesy meteorologiczne oraz na obieg wody w przyrodzie. Co ciekawe, jednym z najważniejszych zastosowań INP jest produkcja sztucznego śniegu z wykorzystaniem preparatu *Snomax*, w którym białkowy ekstrakt z bakterii *Pseudomonas syringae* indukuje i przyspiesza wytwarzanie śniegu [16].

Zastosowanie w rolnictwie

W Stanach Zjednoczonych zniszczenia dokonane przez mróz są odpowiedzialne za więcej strat ekonomicznych niż przez jakiekolwiek inne czynniki pogodowe [17]. Zbadano wiele organizmów, które są w stanie tolerować niskie temperatury dzięki hamowaniu rekrytalizacji lodu. Niektóre gatunki cennej trawy pastewnej *Lolium perenne*

dokonyują sekrecji białek AFP do przestrzeni międzykomórkowej i apoplastu, co zmienia temperaturę zamarzania i rozrastanie się kryształów [18]. Dodatkowo inne rośliny wytwarzają krioprotektanty takie jak trehaloza czy sacharoza, które pozwalają roślinie umożliwić przetrwać niskie temperatury bez ryzyka formowania się kryształów lodu w ich tkankach [19].

Obecnie jako metody zapobiegania zniszczeniom przez mróz, stosuje się głównie metody fizyczne polegające na m.in. używaniu ogrzewaczy czy sztucznej mgły. Generuje to jednak duże koszty, dlatego też badania nad zastosowaniem białek przeciwlodowych w rolnictwie są bardzo pożądane i ekonomicznie uzasadnione.

Badania nad krioprezerwacją na komórkach ssaczyc

Najbardziej obiecującą rolę białka IBP mają do odegrania w krioprezerwacji. Krioprezerwacja pozwala na przechowywanie próbek biologicznych, tkanek czy organów w niskich temperaturach. Głównym powodem śmierci komórek w jej trakcie jest rekrytalizacja lodu. Białka przeciwlodowe potrafią wstrzymać ten proces, dlatego uważa się, że mogą one zwiększyć żywotność komórek po krioprezerwacji poprzez niwelowanie możliwości powstawania uszkodzeń przez rekrytalizację lodu [21]. Wydają się one być dobrym zamiennikiem tradycyjnych krioprotektantów jak DMSO czy glicerol, których wadą jest mało efektywne hamowanie rekrytalizacji, ich cytotoksyczność oraz konieczność użycia ich dużych

stężeń.

Potwierdził to zespół naukowców z Korei Południowej - rekombinowane białka IBP pochodzące z arktycznych drożdży *Glaciozyma sp.* (LeIBP) mogą zwiększyć żywotność krioprezervowanych ssaczych komórek [20], co zostanie przedstawione w dalszej części artykułu. Warto wspomnieć też, że ta sama grupa odkryła wcześniej, że dodatek rekombinowanych białek LeIBP do medium zamrażającego redukuje hemolizę ludzkich czerwonych krwinek po rozmrożeniu.

Materiały i metody

Badania wykonano na linii ludzkich komórek raka szyjki macicy (HeLa), mysich fibroblastach (NIH/3T3), ludzkich preosteoblastach (MC3T3-E1), komórkach jajnika chomiczaka pręgowanego (CHO-K1) oraz ludzkich keranocytach (HaCaT). Do doświadczeń użyto rekombinowanego białka LeIBP, które wyprodukowanego przez metylotroficzne drożdże *Pichia pastoris*.

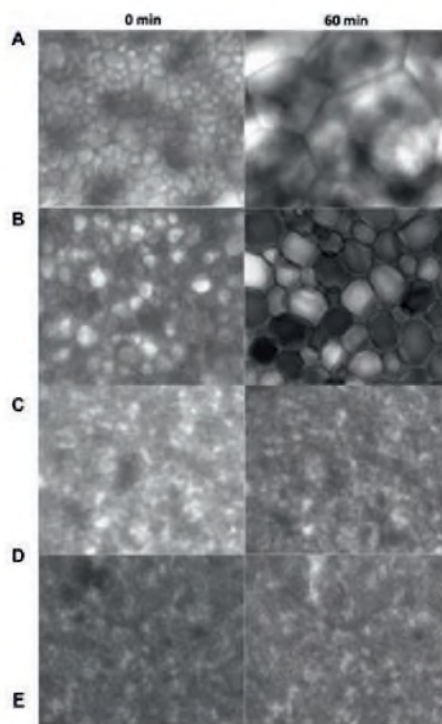
Komórki zostały zamrożone do -80°C w obecności DMSO i roztworu FBS (ang. *fetal bovine serum*; serum płodowe z cieląt) zarówno z dodatkiem LeIBP, jak i bez niego. Przeprowadzono test inhibicji rekrystalizacji lodu, który polegał na tym, że roztwór wodny zawierający różne stężenia białek LeIBP zawieszonych w DMSO został upuszczany jako pojedyncza kropla na schłodzoną do -78°C płytkę aluminiową. Kropla momentalnie zamrażała na niej w formie dysku o średnicy 1 cm i grubości 2 μm , a następnie przenoszono płytkę do inkubacji przez 60 minut

w -6°C . Określono także minimalną dawkę efektywną oraz sprawdzono żywotność komórek po rozmrożeniu pod mikroskopem.

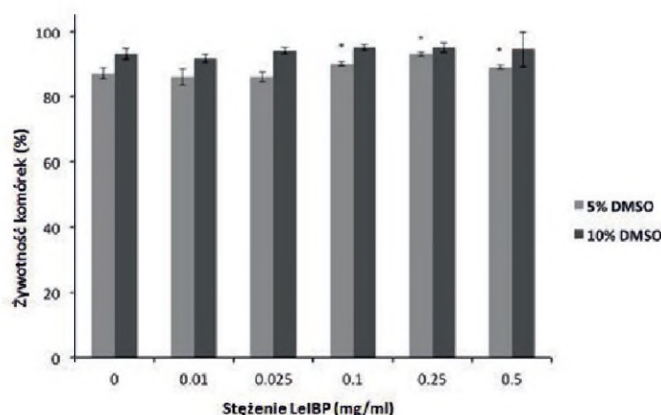
Omówienie wyników

Na wstępie wykonano test inhibicji rekrystalizacji lodu. Krysztal lodu w samym 5% DMSO (tak samo w 2,5%) był mniejszy niż w kontrolnym PBS. W PBS oraz w 2,5% i 5% roztworze DMSO zawierającym LeIBP, rekrystalizacja lodu także została zahamowana. Zatem, LeIBP pozostaje aktywne w obecności DMSO (Ryc.4).

Następnym etapem było sprawdzenie przez badaczy minimalnej efektywnej dawki LeIBP do krioprezervacji.



Ryc. 4. Test inhibicji rekrystalizacji lodu przez LeIBP. Obrazy zostały zrobione w 0 (lewa kolumna) i 60 minucie (prawa kolumna). Od lewej: sam PBS (A), 0 mg/ml LeIBP (B), 0.001 mg/ml LeIBP (C), 0.1 mg/ml LeIBP z 5% DMSO (D) [20]



Ryc. 5. Określenie wartości minimalnej dawki efektywnej LeIBP do krioprezewacji ssaczych komórek. Stężenie LeIBP w komórkach HeLa wynosiło od 0 do 0.5 mg/ml w 5% i 10% DMSO. żywotność komórek HeLa po rozmrożeniu wykonano używając barwienia jodkiem propidyny [20]

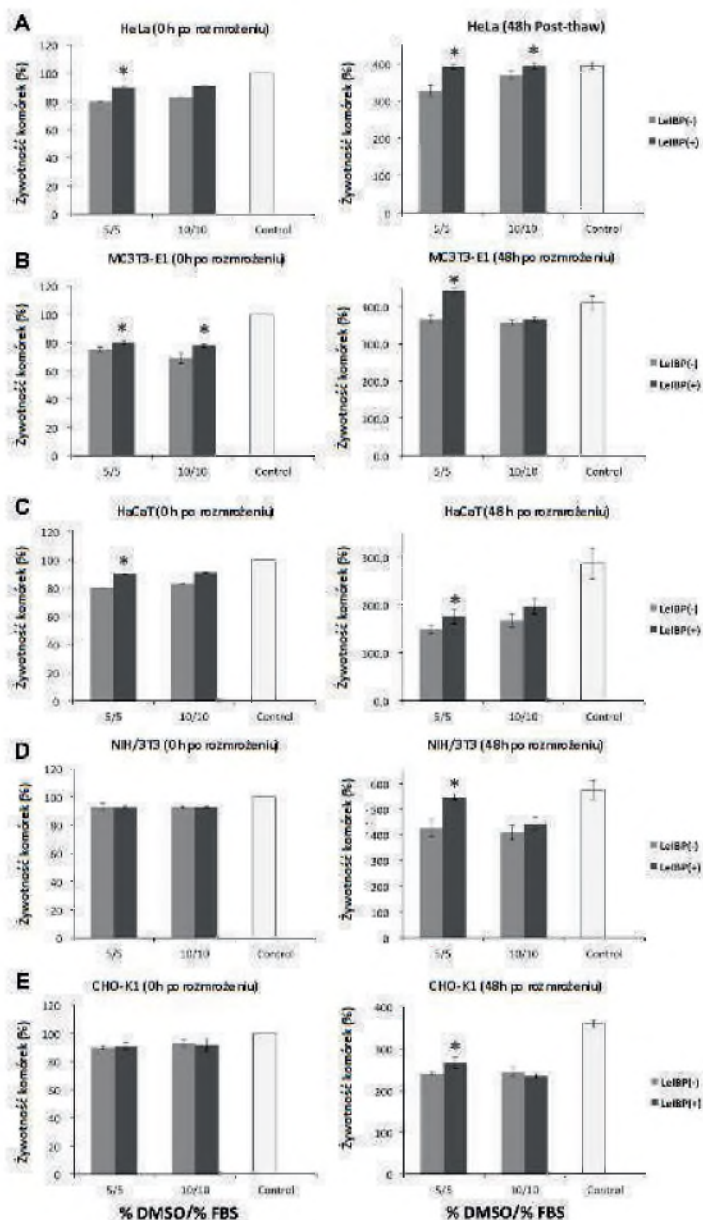
Wartość MEC testowana była dla komórek HeLa oraz NIH/3T3. Dla HeLa wyniosła 0,1 mg/ml LeIBP w 10% DMSO i 0,25 mg/ml LeIBP w 5% DMSO (Ryc. 5). Różnice żywotności w stężeniach większych od 0,1 mg/ml były nieznaczne. Dla komórek NIH/3T3, wartość MEC wynosiła 0,1 mg/ml zarówno w 5% jak i 10% DMSO.

Kolejnym krokiem było zbadanie żywotności krioprezewowanych ssaczych komórek w LeIBP. Żywotność komórek była zwiększona w obecności LeIBP, szczególnie 48 h po rozmrażaniu (Ryc.6). Bezpośrednio po rozmrażaniu, nie zaobserwowano żadnych drastycznych różnic, ale po 48 godzinach żywotność poprawiła się dla wszystkich typów komórek krioprezewowanych w LeIBP w 5% DMSO/5% FBS. Wyniki pokazują też, że 0,1 mg/ml LeIBP w 5% DMSO/5% FBS gwarantuje większą wydajność krioprezewacji niż 10% DMSO/10% FBS, co sugeruje, że dodatek LeIBP zwiększa żywotność komórek ssaczych oraz redukuje cytotoksyczne działanie DMSO. Jednak zupełne zastąpienie DMSO białkami LeIBP nie pozwoliło na uzyskanie pozytywnych rezultatów.

Podsumowanie

Wyniki pokazały, że dodatek LeIBP znacząco zwiększa żywotność różnorodnych ssaczych komórek po krioprezewacji. Są one zgodne z innymi doniesieniami, sugerującymi że użycie innych białek przeciwlodowych, podobnych do przedstawionego w zacytowanej pracy LeIBP, może polepszać żywotność komórek. Co więcej, dodatek LeIBP pozwala na zredukowanie efektu cytotoksyczności DMSO obecnego w medium krioprezewacyjnym do 5% w przedstawionym badaniu. Oznacza to, że białko LeIBP ma duży potencjał do wykorzystania w krioprezewacji komórek eukariotycznych i może nawet zastąpić toksyczne krioprotektanty jak DMSO.

Otwiera to drogę do kolejnych badań nad sposobami zastosowania białek przeciwlodowych w krioprezewacji i w szeroko pojętej medycynie. Pomiń, że białka te są nam znane od przeszło pół wieku, niewiele wiemy o różnorodności ich struktur i dokładnych mechanizmach działania. Ich potencjał jest z pewnością znacznie większy niż możliwości, które poznali-



Ryc. 6. Wydajność krioprezervacji z LeIBP na podstawie żywotności różnych ssaczych komórek. Od lewej: HeLa (A), MC3T3-E1 (B), HaCaT (C), NIH/3T3 (D) i CHO-K1 (E). Szare słupki: komórki zamrożone bez LeIBP, czarne - z LeIBP w stężeniu 0.1 mg/ml. Zamrożone komórki zostały szybko rozmrożone w 37 °C łaźni wodnej przez 2 minuty. Żywotność została określona przy użyciu barwienia jodkiem propidyny. Niezamrożone próbki każdej z linii komórkowych służyły jako próba kontrolna [20]

śmy do tej pory, i poznanie ich lepiej ułatwi efektywne wykorzystanie. Ważnym celem naukowców jest poprawa wydajności produkcji białek IBP, co zmniejszy koszty ich użycia na skalę przemysłową i skomercjalizuje je.

Bibliografia

- [1] Buzzini, P.; Branda, E.; Goretti, M.; Turchetti, B. Psychrophilic yeast from worldwide glacial habitats: Diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012, 82, 217-241.
- [2] Bakermans, C. Limits for microbial life at

- subzero temperatures. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*; Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.C., Gerday, C., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2008.
- [3] Raymond, J.A.; Christner, B.C.; Schuster, S.C. A bacterial ice-binding protein from Vostok ice core. *Extremophiles* 2008, 12, 713–717.
- [4] Firdaus-Raih M, Hashim NHF, Bharudin I, et al. The *Glaciozyma antarctica* genome reveals an array of systems that provide sustained responses towards temperature variations in a persistently cold habitat. *PLoS One*. 2018;13(1):e0189947. Published 2018 Jan 31. doi:10.1371/journal.pone.0189947
- [5] de Menezes GCA, Amorim SS, Gonçalves VN, et al. Diversity, Distribution, and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow of Antarctica. *Microorganisms*. 2019;7(10):445. Published 2019 Oct 12. doi:10.3390/microorganisms7100445
- [6] Bredow M, Tomalty HE, Walker VK. Identification of Plant Ice-binding Proteins Through Assessment of Ice-recrystallization Inhibition and Isolation Using Ice-affinity Purification. *J Vis Exp*. 2017;(123):55302. Published 2017 May 5. doi:10.3791/55302
- [7] Białkowska A, Majewska E, Olczak A, Twarda-Clapa A. Ice Binding Proteins: Diverse Biological Roles and Applications in Different Types of Industry. *Biomolecules*. 2020 Feb 11;10(2):274. doi: 10.3390/biom10020274. PMID: 32053888; PMCID: PMC7072191.
- [8] Xu, H.; Griffith, M.; Patten, C.L.; Galick, B.R. Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol.* 1998, 44, 64–73
- [9] Middleton, A.J.; Marshall, C.B.; Faucher, F.; Bar-Dolev, M.; Braslavsky, I.; Campbell, R.L.; Walker, V.K.; Davies, P.L. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. *J. Mol. Biol.* 2012, 416, 713–724
- [10] Sicheri, F.; Yang, D.S. Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature* 1995, 375, 427–431.
- [11] Gilbert, J.; Davies, P.; Laybourn-Parry, J. A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 145, 67–72.
- [12] Feeney R, Yeh Y. Antifreeze proteins: current status and possible food uses. *Trends Food Sci Tech* 1998;9:102–6.
- [13] Yeh C-M, Kao B-Y, Peng H-J. Production of a recombinant type I antifreeze protein analogue by *L. lactis* and its applications on frozen meat and frozen dough. *J Agr Food Chem* 2009;57:6216–23.
- [14] Zhang S, Wang H, Chen G. Addition of ice-nucleation active bacteria: *Pseudomonas syringae* pv. *panici* on freezing of solid model food. *LWT-Food Sci Technol* 2010;43:1414–8.
- [15] Morris C, Sands D, Vinatzer B et al. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J* 2008;2:321–34.
- [16] Cochet N, Widehem P. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Appl Microbiol Biot* 2000;54:153–61.
- [17] Chevalier R, Hoogenboom G, McClendon R et al. A web-based fuzzy expert system for frost warnings in horticultural crops. *Environ Modell Softw* 2012;35:84–91.
- [18] Middleton A, Marshall C, Faucher F et al. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. *J Mol Biol* 2012;416:713–24.
- [19] Kawahara H. Cryoprotectants and ice-binding proteins. In: Margesin R et al. (eds). *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008, 229–46.
- [20] Kim HJ, Shim HE, Lee JH, Kang YC, Hur YB. Ice-Binding Protein Derived from *Glaciozyma* Can Improve the Viability of Cryopreserved Mammalian Cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25(12):1989–1996. doi:10.4014/jmb.1507.07041
- [21] Naing AH, Kim CK. A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering. *3 Biotech*. 2019;9(9):329. doi:10.1007/s13205-019-1861-y